

BE

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

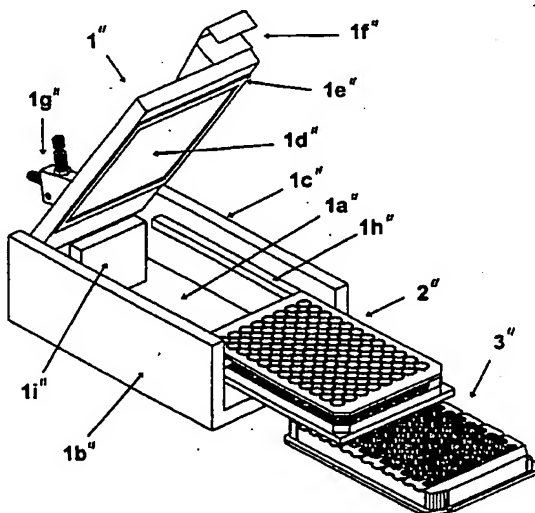
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/06003 A2

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68</p> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06842</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Juli 2000 (18.07.2000)</p> <p>(25) Einreichungssprache: Deutsch</p> <p>(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch</p> <p>(30) Angaben zur Priorität: 199 33 078.6 19. Juli 1999 (19.07.1999) DE</p> <p>(71) Anmelder und (72) Erfinder: MÜLLER, Werner, E., G. [DE/DE]; Semmelweisstrasse 12, D-65203 Wiesbaden-Biebrich (DE).</p> | <p>SCHRÖDER, Heinz, C. [DE/DE]; Hans-Bredow-Strasse 37a, D-65189 Wiesbaden (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BATEL, Renato [HR/HR]; Marco Garbin 2, 52210 Rovinj (HR).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: MÜLLER, Werner, E., G.; Semmelweisstrasse 12, D-65203 Wiesbaden-Biebrich (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.</p> |
|--|--|

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DETERMINING DNA DOUBLE/SINGLE STRAND BREAKS AND DEVICE FOR CARRYING OUT THE CONTROLLED FILTRATION OF, IN PARTICULAR, DNA MOLECULES WITH WELL FILTER PLATES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND KIT ZUR BESTIMMUNG VON DNA-DOPPEL-/EINZELSTRANGBRÜCHEN UND VORRICHTUNG ZUM KONTROLLIERTEN FILTRIEREN VON INSBESONDERE DNA-MOLEKÜLEN MIT WELL-FILTER-PLATTEN



(57) Abstract: The invention relates to, among other things, a method for determining double strand breaks which comprises the following steps: a) depositing cells and/or tissues to be examined on specific filters; b) lysis of the cells/tissue with at least one detergent, with at least one chaotropic substance, and with at least one fluorescence dye that binds specifically a DNA double strand; c) elution of the DNA fragments, released by the lysis, through the specific filters, and; d) carrying out a fluorescence spectroscopic evaluation, whereby only one eluate fraction is collected per well.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/06003 A2



(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Es wird unter anderem ein Verfahren zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen bereitgestellt, mit folgenden Schritten: a) Aufgabe von zu untersuchenden Zellen und/oder Geweben auf spezifische Filter; b) Lyse der Zellen/Gewebe mit mindestens einem Detergens, mindestens einer chaotropen Substanz und mindestens einem spezifisch DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff; c) Elution der durch die Lyse freigesetzten DNA-Bruchstücke durch die spezifischen Filter; d) Durchführen einer fluoreszenzspektroskopischen Auswertung, wobei pro Well nur eine Eluat-Fraktion gesammelt wird.

Verfahren und Kit zur Bestimmung von DNA-Doppel-/Einzelstrangbrüchen und Vorrichtung zum kontrollierten Filtrieren von insbesondere DNA-Molekülen mit Well-Filterplatten

Die Erfindung betrifft im allgemeinen u.a. Verfahren und Kits zur Bestimmung von DNA-Doppel- oder DNA-Einzelstrangbrüchen.

Die Erfindung betrifft im besonderen zum einen ein Verfahren und einen Kit zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen, entsprechende Verwendungen, Vorrichtungen zum kontrollierten Filtrieren von insbesondere DNA-Moleküle und/oder andere Moleküle/Molekülkomplexe enthaltenden flüssigen Medien mit Well-Filterplatten und verschiedene Verwendungen.

Vom Stand der Technik ist eine Reihe von Assays zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen bekannt. Es handelt sich insbesondere um die neutrale Filterelution, die Pulsed-Field-Gelelektrophorese und den neutralen Komet-Assay (Elia et al., Pharmacol. Ther. 51:291-327; 1991; Sarkaria et al., Radiat. Res. 150:17-22; 1998; Prise et al., Int. J. Radiat. Biol. 74:173-184; 1998).

Bei der Filterelution werden die auf DNA-Schäden zu untersuchenden Zellen auf Filter gegeben und zunächst mit einer neutralen Lyselösung zur Entfernung von Nicht-DNA-Anteilen behandelt. Die DNA bleibt dabei auf dem Filter zurück. Danach werden die Filter mit der darauf befindlichen DNA langsam über mehrere Stunden mit einer geeigneten Lösung durchströmt, wobei die ausgewaschene Lösung in *mehreren* Fraktionen gesammelt wird. Die Verteilung der DNA zwischen den gesammelten Fraktionen wird gemessen. Diese Prozedur ist sehr zeitaufwendig (Arbeitsdauer in der Regel mehr als 10 Stunden), kompliziert in der Durchführung; störanfällig (häufiges Undichtwerden der Filter und Filterhalter), und sie kann nur zur gleichzeitigen Bestimmung von Doppelstrangbrüchen bei einer relativ kleinen Anzahl von Proben angewandt werden.

Bei der Pulse-Field-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Agarose-Gelelektrophorese, mit der zwar DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden können, die nur mit einem 1 Gy ionisierender Strahlung induziert wurden, die jedoch inhärente Probleme bei der Messung der Strangbruch-Reparatur aufweist. Die Pulsed-Field-Gelelektrophorese läßt sich am besten mit Zellsuspensionen nicht jedoch mit Gewebeproben durchführen. Zur Durchführung dieser Methode ist eine kostenaufwendige Apparatur erforderlich. Die Prozedur ist zeitaufwendig (ca. 24 Stunden) und ermöglicht nur eine gleichzeitige Bestimmung von relativ wenig Proben.

Beim Komet-Assay ("single-cell gel electrophoresis") werden DNA-Strangbrüche in Einzelzellen gemessen. Zu diesem Zweck werden die Zellen in "low melting point"-Agarose auf einem Objektträger suspendiert. Der Objektträger wird dann in einen Lysepuffer gegeben und anschließend in den Elektrophoresepuffer. Während der Elektrophorese wandert die geschädigte DNA in Richtung Anode unter Ausbildung eines Kometenschweifs. Je größer das Ausmaß des Schadens (Anzahl der Strangbrüche), desto größer ist der resultierende Schweif. Doppelstrangbrüche werden unter neutralen Bedingungen und Einzelstrangbrüche unter alkalischen Bedingungen gemessen. Nachteilig bei dieser Methode ist, daß Bestimmungen von DNA-Schäden in Geweben nicht möglich sind. Darüberhinaus benötigt das Verfahren zur Auswertung einen kostenaufwen-

gen Image-Analyser sowie erfahrenes Personal für die Interpretation der Ergebnisse. Schließlich ist die Zeitdauer für die Probenvorbereitung vor der Lyse verhältnismäßig hoch.

EP 0 359 249 offenbart u.a. eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Filtrieren von flüssigen Medien mit Well-Filterplatten im Verbund mit Mikrotiterplatten. Bei dieser Vorrichtung ist ein Anschluß zum Anlegen eines Unterdrucks unterhalb der jeweiligen Filter vorgesehen. Nachteilig hierbei ist die relativ komplizierte Ausgestaltung der Vorrichtung, wobei darüberhinaus beim Verfahren nicht immer ein kontrolliertes Filtrieren von flüssigen Medien gewährleistet ist. Bei dem kommerziell erhältlichen MultiScreen-Vakuumfiltrationssystem (Firma Millipore GmbH) läßt sich das für ein langsames Hindurchsaugen der Proben erforderliche Vakuum, das für das in dieser Anmeldung beschriebene Verfahren zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen notwendig ist, auch mit Hilfe des Vakuumschiebeschalters an diesem Gerät nicht aufbauen.

Aus dem vorgenannten ergibt sich das Problem, die oben aufgeführten Nachteile zumindest teilweise zu beseitigen. Das sich ergebende Problem besteht insbesondere darin, ein Verfahren und ein Kit zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen bereitzustellen, die eine hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit aufweisen und gleichzeitig eine Schnellbestimmung der DNA-Schäden (Arbeitsdauer weniger als 3 Stunden) bei einem hohen Probendurchsatz (z.B. parallele Bestimmung einer größeren Anzahl von Proben, beispielsweise von 96 Proben bei Verwendung von 96-Well-Mikrotiterplatten) ermöglichen. Darüberhinaus besteht das Problem darin, eine Vorrichtung und ein Verfahren bereitzustellen, die eine verbesserte Kontrollierbarkeit der Filtration gewährleisten. Für ein solches Verfahren besteht ein dringender Bedarf, beispielsweise in der Medizin (Bestimmung der optimalen Strahlendosis bei Strahlentherapiepatienten) oder beim Umwelt-Monitoring (Nachweis des Effektes genotoxischer Substanzen).

Dieses Problem wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren nach Anspruch 1, einen Kit nach Anspruch 3, Vorrichtungen nach den Ansprüchen 4 und 5, Verfahren nach Anspruch 6, und Verwendungen nach Anspruch 10 gelöst.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden zunächst die zu untersuchenden Zellen und/oder Gewebe auf spezifische Filter gegeben. Bei diesen kann es sich um handelsübliche, für diese Zwecke geeignete Filtertypen handeln, beispielsweise MultiScreen Filtrationsplatten der Firma Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland) mit Durapore-Membranen (z.B. 0,22 µm Porengröße). In Abhängigkeit von der DNA-Länge können Membranen mit kleineren oder größeren Porengrößen vorteilhaft sein.

Anschließend werden die Zellen/Gewebe lysiert in Gegenwart von mindestens einem Detergens, beispielsweise SDS (Natriumdodecylsulfat), mindestens einer chaotropen Substanz, beispielsweise Harnstoff, und mindestens einer Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz, beispielsweise EDTA, oder mindestens einer Protease, beispielsweise Proteinase K. Schon in diesem Schritt kann mindestens ein spezifisch DNA-Doppelstrang bindender Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben werden. Die Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz ist notwendig, da erstens Metallionen zur Querver-

netzung der DNA führen können und dadurch deren Elution beeinträchtigen und zu einer fehlerhaften Einschätzung des Anteils an intakter DNA führen können und da zweitens DNA-Reparaturenzyme zu einer Elimination der zu messenden DNA-Schäden führen. Alternativ dazu kann eine Protease verwendet werden, da dadurch bei der Lyse DNA-Reparaturenzyme abgebaut werden, die sonst zu einer Elimination der zu messenden DNA-Schäden führen würden.

Danach werden die durch die Lyse freigesetzten DNA-Bruchstücke durch die Filter mit einer kontrollierten, konstanten Elutionsgeschwindigkeit eluiert und danach eine fluoreszenzspektroskopische Auswertung durchgeführt. Die Elution wird insbesondere durch die erfindungsgemäßen Vorrichtungen zum kontrollierten Filtrieren von flüssigen Medien mit Filterplatten durchgeführt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren macht man sich die Erkenntnis zunutze, daß nach der Zellyse und der gleichzeitig in der Lyselösung stattfindenden Disintegration der DNA-Histon-Komplexe die freigesetzten DNA-Moleküle mit der Lyse/Elutions-Lösung ausgewaschen werden. Die Elution der DNA-Moleküle verläuft dabei umso schneller, je kürzer sie sind ("Siebeffekt"). Das Verfahren erlaubt somit die Bestimmung der Zahl der Doppelstrangbrüche der DNA.

Beim Lyse-Schritt beträgt vorteilhafterweise die Konzentration der chaotropen Substanz 2 bis 4 mol/l, da in diesem Bereich eine ausreichende Zell-Lyse und Denaturierung bewirkt wird, ohne daß der Quencheffekt zu stark wird. Darüberhinaus beträgt die Konzentration der Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz vorteilhafterweise 0,005 bis 0,05 mol/l, da in diesem Bereich eine ausreichende Wirksamkeit gewährleistet ist. Von Vorteil ist es, wenn der pH-Wert beim Lyse-Schritt auf 7 bis 11 eingestellt wird, da in diesem Bereich eine optimale Zell-Lyse beobachtet wird, ohne daß eine DNA-Entwindung eintritt (Trennung der beiden DNA-Stränge bei höheren pH-Werten).

Von besonderem Vorteil ist es, wenn die Konzentration der chaotropen Substanz beim Lyse-Schritt 2,25 mol/l beträgt, da bei dieser Konzentration ein Optimum zwischen Denaturierung einerseits und Anfärbbarkeit (mit dem Fluoreszenzfarbstoff: nur geringer Quencheffekt) andererseits vorliegt. Weiterhin ist es von Vorteil, wenn die Konzentration der Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz des Lyseschlusses 0,02 mol/l beträgt, da dadurch eine ausreichende Entfernung von Spuren an Schwermetallen (die zu Quervernetzungen der DNA führen können) bei gleichzeitig starker Herabsetzung des die Messungen beeinträchtigenden Quencheffekts sichergestellt werden kann.

Die nachfolgenden Ausführungsformen sind vorteilhaft, da sich diese in der Praxis bewährt haben: Die Konzentration des Detergens (insbesondere von SDS) beträgt 0,00175 mol/l; die Konzentration der Protease beträgt beim Lyse-Schritt 0,5 mg/ml; es wird als chaotrope Substanz Harnstoff verwendet; es wird als Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz EDTA verwendet; als Protease wird Proteinase K verwendet; als Detergens wird SDS verwendet; der pH-Wert bei der Lysierung beträgt 10,0. Schließlich hat sich der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen als ausgesprochen zuverlässig und somit vorteilhaft bewährt.

Das Verfahren besitzt folgende Vorteile:

1. Das Verfahren benötigt nur einen geringen Zeitaufwand (etwa eine Stunde).

2. Das Verfahren ist hochsensitiv; nur geringe Mengen an Proben-DNA sind erforderlich (etwa 30 ng DNA pro Well; dies entspricht etwa 3000 Zellen oder 25 µg Gewebe).
3. Das Verfahren erlaubt einen hohen Probendurchsatz (Durchführung von 96 Bestimmungen pro Stunde bei Verwendung einer Filtrationsvorrichtung mit einer 96-Well-Mikrofilterplatte).
4. Das Verfahren kann mit nichtradioaktiver DNA durchgeführt werden.
5. Das Verfahren kann nicht nur für Zellen sondern auch für Gewebeproben angewendet werden.
6. Die Durchführung des Verfahrens ist einfach und erfordert keine besonderen Fachkenntnisse.

Der nachfolgende Kit zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen weist die oben genannten Vorteile auf: Der Kit enthält mindestens ein Detergens, mindestens eine chaotrope Substanz, mindestens einen spezifisch DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff und mindestens einen spezifischen Filtertyp.

Die folgenden Ausführungsformen des Kits sind aus obigen Gründen vorteilhaft: Der Kit enthält mindestens eine Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz. Der Kit enthält mindestens eine Protease. Die Konzentration der chaotropen Substanz bei der Lyse beträgt 2 bis 4 mol/l. Die Konzentration der Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz bei der Lyse beträgt 0,005 bis 0,05 mol/l. Die Protease ist Proteinase K. Die Konzentration der Protease beim Lyse-Schritt beträgt 0,01 bis 5 mg/ml.

Die nachfolgenden Verwendungen des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Kits weisen die oben aufgeführten überraschenden und vorteilhaften Eigenschaften ebenso auf. Es geht hierbei insbesondere um Verwendungen zum:

- Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen und Quervernetzungen in humanen, tierischen oder pflanzlichen Geweben und Zellen, in Bakterien und Einzellern, in Zelllinien humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs und subzellulären Fraktionen, sowie in isolierter DNA;
- Nachweis von DNA-Reparatur in humanen, tierischen oder pflanzlichen Geweben und Zellen, in Bakterien und Einzellern, in Zelllinien humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, subzellulären Fraktionen, Zell-Lysaten und Zell-Extrakten (isolierte Moleküle);
- Zur Messung des Auftretens von DNA-Doppelstrangbrüchen und Quervernetzungen und deren Reparatur nach Bestrahlung, Chemotherapie und/oder Behandlung mit Gentoxinen in humanem und tierischem Probenmaterial, Gewebeschnitten und Zellsuspensionen;
- Messung des Auftretens von DNA-Doppelstrangbrüchen und Quervernetzungen und deren Reparatur in Geweben und Zellen von Patienten bei Strahlentherapie;
- Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen in gefrorenen Untersuchungsmaterialien (beispielsweise Biopsieproben) nach deren schonender Homogenisation in flüssigem Stickstoff oder flüssiger Luft in Gegenwart eines Gefrierschutzmittels (beispielsweise Dimethylsulfoxid);
- Nachweis des Auftretens von DNA-Doppelstrangbrüchen und Quervernetzungen und deren Reparatur bei berufsbedingter Exposition von Personen, die entweder bei ihrer beruflichen Arbeit (beispielsweise Flugpersonal, Röntgenärzte) oder infolge von Unfällen (beispielsweise Reaktorunfälle) mit DNA-schädigenden Substanzen oder Strahlen in Kontakt kommen;

- Messung des Auftretens von DNA-Doppelstrangbrüchen und Quervernetzungen und deren Reparatur in Testorganismen, Geweben, Zellen oder Zelllinien bei der Gewässerüberwachung.

Bei den erfindungsgemäßen Vorrichtungen zum kontrollierten Filtrieren von flüssigen insbesondere DNA-Moleküle und/oder andere Moleküle/Molekülkomplexe enthaltenden Medien mit Well-Filterplatten, mit mindestens einer Well-Filterplatte und mindestens einer korrespondierenden Microtiterplatte handelt es sich um folgende Ausführungsformen:

Die erste Ausführungsform (das erste Gerät) ist gekennzeichnet durch zwei voneinander getrennte, ober- und unterhalb der Filterplatte angeordnete Gasräume, mindestens eine mit einem Behälter und der Well-Filterplatte zusammenwirkende und damit eine Trennung der beiden Gasräume erzeugende Dichtungseinrichtung, eine Einrichtung zum Verbinden beider Gasräume und eine Einrichtung zum Druckausgleich zwischen Umgebung und einem Gasraum.

Der eine Gasraum befindet sich oberhalb der Filterplatte und der darunter angeordneten Microtiterplatte, in deren Wells zuvor (vor dem Einlegen der Filterplatte in die Vorrichtung) das zu filtrierende Medium appliziert wird. Unterhalb der Filterplatte befindet sich ein zweiter, vom ersten Gasraum getrennter Gasraum. Zunächst werden beide Gasräume mittels eines in einer Bohrung angeordneten Hahns (diese Ausführungsform hat sich in vorteilhafter Weise bewährt) miteinander verbunden, so daß in beiden Gasräumen der Druck gleich hoch ist. Beide Gasräume werden über die Absaugeinrichtung, beispielsweise ein mit einer entsprechenden Vakuumpumpe verbundenes Saugrohr, evakuiert bzw. ein Unterdruck bezüglich der Umgebung hergestellt und danach beide Gasräume voneinander getrennt (beispielsweise durch Zudrehen des Hahns). Die vorher geschlossene Einrichtung zum Druckausgleich zwischen Umgebung und dem oberen Gasraum wird nun vorsichtig zur Umgebung hin (also zur Außenatmosphäre hin) geöffnet, so daß der Druck im oberen Gasraum sehr langsam und dosiert im Vergleich zum Gasdruck des unteren Gasraums erhöht werden kann. Auf diese Art und Weise ist ein kontrolliertes Filtrieren des flüssigen Mediums möglich, insbesondere für die Lösungen zur Messung von DNA-Doppelstrangbrüchen.

Der bei herkömmlichen Vorrichtungen und Verfahren notwendige "Ansaugdruck" (Anpreßdruck der zwischen Filtrationsplatte und korrespondierender Microtiterplatte angeordneten Dichtungseinrichtung, insbesondere in Form eines Gummirings, zum Abdichten zwischen den beiden Gasräumen) ist in der Regel so hoch, daß ein kontrolliertes Filtrieren nicht möglich ist. Der Vorteil des in der erfindungsgemäßen Vorrichtung angewandten Prinzips besteht darin, daß der Filtrationsvorgang mit konstanter Geschwindigkeit durchgeführt werden kann, ohne Auftreten des bei Absaugvorrichtungen, die durch Anlegen eines Unterdrucks betrieben werden, auftretenden initialen Drucksprungs infolge des Ansaugvorgangs (Anpreßvorgang an den Dichtungsring).

Insbesondere die beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Messung von DNA-Doppelstrangbrüchen notwendigen niedrigen Filtrations/Elutionsgeschwindigkeiten im Bereich von wenigen Mikrolitern je Minute sind mittels konventioneller Vorrichtungen und Verfahren nicht zu realisieren, stellen jedoch für die erfindungsgemäßen Vorrichtungen und Verfahren kein Problem dar.

Die zweite Ausführungsform (zweites Gerät) ist gekennzeichnet durch zwei voneinander getrennte, ober- und unterhalb der Filterplatte angeordnete Gasräume, mindestens eine mit einem Behältnis und der Well-Filterplatte zusammenwirkende und damit eine Trennung der beiden Gasräume erzeugende Dichtungseinrichtung und eine für einen Gasraum fungierende Druckbeaufschlagungseinrichtung. Der eine Gasraum befindet sich oberhalb der Filterplatte und der darunter angeordneten Mikrotiterplatte, in deren Wells zuvor (vor dem Einlegen der Filterplatten in die Vorrichtung) das zu filtrierende Medium appliziert wird. Unterhalb der Filterplatte befindet sich ein zweiter, vom ersten Gasraum getrennter Gasraum. Nach der Applizierung des Mediums in die jeweiligen Wells der Filterplatte wird in einem der beiden Gasräume, vorzugsweise im oberen, mittels der Druckbeaufschlagungseinrichtung ein gegenüber dem unteren Gasraum höherer Druck, insbesondere 0,01 bar, auf das zu filtrierende Medium beaufschlagt. Auf diese Art und Weise ist ein kontrolliertes Filtrieren des flüssigen Mediums möglich, insbesondere für die Lösungen zur Messung von DNA-Doppelstrangbrüchen.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren, welches eine der erfindungsgemäßen Filtrationsvorrichtungen verwendet, weist die oben genannten überraschenden und vorteilhaften Eigenschaften auf. Dies gilt auch für die entsprechenden Verwendungen.

Es geht hierbei um Verwendungen: zum Nachweis und Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen, von Quervernetzungen von DNA-Molekülen untereinander oder mit anderen Molekülen sowie von weiteren DNA-Schäden; für Bindungsstudien, zur Untersuchung von DNA-Protein- oder Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen und zur Bestimmung der Dissoziations-/Assoziationskonstanten dieser Reaktionen; zur Filtration radioaktiver Materialien mit optionaler autoradiographischer Detektion der auf den Filtern gebliebenen Radioaktivität; zur Filtration infektiöser Proben; zur Filtration sauerstoffempfindlicher Proben; zur Filtration unter sterilen Bedingungen.

Die Erfindung betrifft insbesondere weiterhin ein Verfahren zur Bestimmung von DNA-Einzelstrangbrüchen, eine Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe, ein Kit zur Bestimmung von DNA-Einzelstrangbrüchen, eine Verwendung des Kits sowie Verwendungen des Verfahrens und des Kits.

DE 197 24 781 A1 offenbart u.a. eine Mikromethode zur Schnellbestimmung von DNA-Schäden und deren Reparatur unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Picogreen. Bei dem dort beschriebenen Verfahren werden die zu untersuchenden Zellen zunächst unter Zuhilfenahme von SDS mit einer 9 molaren Harnstofflösung lysiert. Dabei werden ca. 200 mmol/l EDTA und ein entsprechender spezifisch DNA-Einzelstrang- oder DNA-Doppelstrang bindender Fluoreszenzfarbstoff, insbesondere Picogreen, hinzugegeben. Eine Natronlauge-Lösung mit einem pH-Wert von ca. 12,5 wird hinzugesetzt und anschließend fluoreszenzspektroskopisch ausgewertet. Bei diesem Verfahren ist die hohe Konzentration des Harnstoffs notwendig, um die gewünschte Denaturierung sicherzustellen. Darüber hinaus müssen ca. 200 mmol/l EDTA verwendet werden, um eine vollständige Komplexierung von die DNA vernetzenden Metallionen zu gewährleisten.

Nachteilig bei diesem Verfahren ist der Einsatz von hohen Substanzmengen, die zu einem hohen Quencheffekt bei der Fluoreszenzauswertung führen und die Ergebnisse unter Umständen stark verfälschen können. Darüber hinaus ist die Empfindlichkeit der vorstehenden Methode teilweise nicht befriedigend, insbesondere für die Bestimmung von DNA-Strangbrüchen in (kürzeren) DNA-Molekülen von niederen Organismen (wichtig für die Untersuchung der Effekte von Umweltpollutionen) sowie für die Bestimmung von DNA-Strangbrüchen bei Strahlentherapiepatienten in dem bei der Strahlentherapie angewandten Dosisbereich (0,5 – 3,0 Gy Einzeldosis).

Aus dem vorgenannten ergibt sich das Problem die oben aufgeführten Nachteile zumindest teilweise zu beseitigen. Das sich ergebende Problem liegt insbesondere darin, ein Verfahren und ein Kit zur Bestimmung von DNA-Einzelstrangbrüchen bereitzustellen, die einen geringen Quencheffekt, eine hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit und eine gute Reproduzierbarkeit aufweisen und gleichzeitig eine Schnellbestimmung der DNA-Schäden (Arbeitsdauer weniger als 3 Stunden) bei einem hohen Probendurchsatz (z.B. parallele Bestimmung von 96 Proben in 96-Well-Mikrotiterplatten oder Bestimmung noch größerer Probenzahlen durch Verwendung von Mikrotiterplatten mit einer noch größeren Anzahl an Wells) ermöglichen.

Dieses Problem wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren nach Anspruch 7 und einen Kit nach Anspruch 9 gelöst. Außerdem werden erfindungsgemäß nach Anspruch 10 eine Verwendung des Verfahrens sowie Verwendungen des Kits beansprucht.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden zunächst zu untersuchende Zellen und/oder Gewebe mit mindestens einem Detergens beispielsweise SDS (Natriumdodecylsulfat) und mindestens einer chaotropen Substanzlösung, beispielsweise Harnstoff, lysierend versetzt. Die Lyse findet in Gegenwart mindestens einer Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz statt. Mindestens ein spezifisch DNA-Einzel- oder DNA-Doppelstrang bindender Fluoreszenzfarbstoff wird beim Lyse-Schritt oder dem danach folgenden Schritt zugesetzt.

Der nach der Lyse folgende Schritt ist das Versetzen der die lysierten Zellen und/oder Gewebe enthaltenden Suspensionen mit mindestens einer Lösung, die es erlaubt, die Zell-/Gewebesuspension auf einen alkalischen pH-Wert einzustellen und die mindestens eine Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz aufweist.

Durch den nochmaligen Zusatz mindestens einer Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz bei dem auf die Lyse folgenden Schritt ist völlig überraschend die Empfindlichkeit und Genauigkeit höher als die beim in DE 197 24 781 A1 offenbarten Verfahren.

Wichtig beim erfindungsgemäßen Verfahren ist, daß man einen Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der entweder spezifisch einzelstrang- oder spezifisch doppelstrangbindend ist. Hintergrund für diese Anforderung ist die Tatsache, daß sich der Farbstoff spezifisch entweder spezifisch an Einzel- oder an Doppelstränge der DNA heften muß, um den Anteil der jeweiligen Strangtypen zu ermitteln. Beispielsweise können als selektiv oder als annähernd selektiv doppelstrangbindend Cyaninfarbstoffe wie PicoGreen und als selektiv einzelstrangbindend OliGreen verwendet werden.

Dem erfindungsgemäßen Verfahren liegt folgendes Prinzip zugrunde: In der doppelsträngigen DNA sind zwei Polynucleotidketten (DNA-Einzelstränge) über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen jeweils zwei komplementären Basen miteinander verknüpft. Beide Polynucleotidketten sind dabei unter Ausbildung einer rechtsgängigen Doppelspirale (Helix) umeinander gewunden. Aufgrund dieser Struktur bleiben die beiden DNA-Einzelstränge der DNA auch dann noch aneinander haften, wenn in ihnen Brüche auftreten. Solche DNA-Einzelstrangbrüche gehören zu den häufigsten DNA-Schäden. Voraussetzung dafür, daß die beiden DNA-Einzelstränge noch zusammenbleiben, ist, daß die Brüche – was meist der Fall ist – auf den beiden Strängen gegeneinander versetzt sind. Setzt man nun die DNA oder die gesamte Zelle einer stark alkalischen Lösung aus, lösen sich die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Einzelsträngen. Da die Moleküle jedoch umeinandergewickelt sind, fallen sie nicht sofort auseinander. Beide Einzelstränge müssen zunächst voneinander entwunden werden. DNA-Moleküle, deren Einzelstränge Brüche aufweisen, entwinden sich dabei schneller als intakte DNAs.

Der Anteil an doppelsträngiger DNA läßt sich dann mit Hilfe von spezifisch DNA-Doppelstrang bindenden oder spezifisch DNA-Einzelstrang bindenden fluoreszierenden Farbstoffen über eine fluoreszenzspektroskopische Analyse ermitteln. Die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ist von der Menge an Doppel- bzw. Einzelstrang-DNA abhängig, so daß über die Messung der Intensität der Fluoreszenz-Emission im Bereich des Maximums des Fluoreszenz-Emissions-Spektrums entweder die Zunahme der Einzelstränge bzw. die Abnahme der Doppelstränge zu ermitteln ist. In der Regel findet die im Dunkeln und mit Eis gekühlte Lyse direkt in den entsprechenden Wells einer Mikrotiterplatte statt und dauert ca. 30 bis 60 Minuten. Anschließend werden die lysierten Zellen und/oder Gewebe mit mindestens einer zur Einstellung des zur DNA-Entwindung (Schritt b) benötigten pH-Wertes (insbesondere pH 11 bis 12) dienenden Lösung versetzt, die eine Konzentration, insbesondere von 0,005 bis 0,01 mol/l, einer Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz, beispielsweise EDTA, aufweist (s. o.).

Bei diesem pH-Wert entwinden sich – wie oben erläutert – die Doppelstränge der DNAs, so daß in zeitlich vorzugsweise regelmäßigen Abständen über eine konventionelle fluoreszenzspektroskopische Analyse die DNA-Einzelstrangbrüche bestimmt werden können. Die einzelnen Schritte sollten dabei unter temperaturkontrollierten Bedingungen ablaufen, um eine gute Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können. Dabei können übliche Temperaturwerte im Bereich von 0 °C bis + 30 °C je nach Einzelfall verwendet werden.

In bewährter und somit vorteilhafter Weise beträgt die Konzentration der chaotropen Substanz beim Lyse-Schritt 2 bis 4 mol/l, da nur in diesem Konzentrationsbereich eine ausreichende Lyse und Denaturierung erreicht wird, ohne daß es zu einer zu starken Herabsetzung der Fluoreszenz infolge des Quencheffektes der chaotropen Substanz kommt. Weiterhin beträgt in vorteilhafter da bewährter Weise die Konzentration der Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz beim Lyse-Schritt 0,005 bis 0,05 mol/l. Dies ist ebenso beim Schritt b.) vorteilhaft. In diesem Konzentrationsbereich wird erstens eine ausreichende Entfernung von Metallionen erzielt, die zu einer Quervernetzung der DNA und damit zu einer Beeinträchtigung

der DNA-Entwindung führen können und zweitens eine ausreichende Hemmung der DNA-Reparaturenzyme, welche die vorhandenen DNA-Schäden wieder eliminieren, ohne daß hierbei ein zu starker Quencheffekt eintritt. Der pH-Wert wird vorteilhaft (da bewährt) auf 11 bis 12 eingestellt, da niedrigere pH-Werte zu keiner ausreichenden Entwindung der DNA führen und höhere pH-Werte die Anfärbbarkeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff beeinträchtigen.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren sind – neben den oben aufgeführten – mehrere Tatsachen überraschend und für den Erfolg des Verfahrens mit ausschlaggebend: Durch den auf nochmaligen Zusatz mindestens einer Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz bei dem auf die Lyse folgenden Schritt ist völlig überraschend die Empfindlichkeit und Genauigkeit höher als die beim in DE 197 24 781 A1 offenbarten Verfahren. Darüberhinaus ist beim Lyse-Schritt die Verwendung einer weniger als 4,5 molar konzentrierten Lösung einer chaotropen Substanz, beispielsweise Harnstoff, überraschend, da aus der DE 197 24 781 A1 diese hohe Konzentration als zwingend vorausgesetzt angesehen worden ist (siehe auch allgemeine Lehrbücher wie beispielsweise: "Biochemie", Stryer, 4. Auflage, Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg, 1990, S: 32 – 33; Verwendung einer 8 molaren Harnstofflösung bei der Lyse zur Denaturierung). Unerwarteterweise verbessert sich die Anfärbbarkeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff (Bindung des Farbstoffs an die DNA). Aufgrund dieser Tatsache erhöht sich die Genauigkeit gegenüber der in DE 197 24 781 A1 offenbarten Methode dramatisch. Weiterhin kann die Konzentration einer Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanzlösung überraschenderweise weniger als 200 mmol/l betragen, wobei auch dieser Konzentrationsbereich offenbar für eine ausreichende Entfernung von Schwermetallspuren ausreicht und darüberhinaus unerwarteterweise der störende Quencheffekt herabgesetzt werden konnte.

Die Durchführung des gesamten Verfahrens (Lyse, Entwindung, und fluoreszenzspektroskopische Auswertung) kann im Gegensatz zur FADU-Methode (Birnboim and Jevcak, Cancer Res. 1981, 41:1889-1892) auch auf 96-Well-Mikrotiterplatten (oder Mikrotiterplatten mit einer anderen Well-Zahl) vorgenommen werden. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es auch erstmals möglich, eine kontinuierliche Messung der DNA-Entwindungskinetik in ein und demselben Ansatz ohne Abstoppen der Reaktion vorzunehmen.

Von besonderem Vorteil ist es, wenn die Konzentration der chaotropen Substanz 2,25 mol/l beträgt, da bei dieser Konzentration ein Optimum zwischen Denaturierung einerseits und Anfärbbarkeit andererseits vorliegt. Weiterhin ist es von Vorteil, wenn die Konzentration der Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanzlösung des ersten Schrittes 0,02 mol/l beträgt, da eine noch ausreichende Entfernung von Spuren an Schwermetallen bei gleichzeitig starker Herabsetzung des Quencheffekts sichergestellt werden kann. Die Konzentration der Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanzlösung des zweiten Schrittes (Entwindung) beträgt vorteilhafterweise 0,02 mol/l, da höhere Konzentrationen einiger dieser Substanzen wie z.B. EDTA selbst Strangbrüche induzieren können und niedrigere Konzentrationen keinen effizienten Metallionen komplexierenden Effekt bzw. DNA-Reparaturenzyme hemmenden Effekt und keine ausreichende Pufferwirkung mehr ausüben.

Die nachfolgenden Ausführungsformen sind vorteilhaft, da sich diese in der Praxis bewährt haben: Die Konzentration des Detergens (SDS) beträgt 0,00175 mol/l; es wird als chaotrope Substanz Harnstoff verwendet; es wird als Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz EDTA verwendet; der pH-Wert beträgt bei der Lyse 10,0; der pH-Wert der entstehenden Lösung nach Zugabe der Lösung des zweiten Schrittes beträgt 11,5.

Grundsätzlich sollte ein solcher pH-Wert (11,5) für die Entwindung (Denaturierung) ungeeignet sein, da beispielsweise bei der Methode der alkalischen Filterelution (siehe auch Kohn, Pharmacol. Ther., 1991, 49: 55-77; Kohn et al., Biochemistry 1976, 15: 4629-4637) ein pH-Wert zwischen 12,3 und 12,7 zwingend verwendet werden muß. Trotz des relativ niedrigen pH-Wertes findet dennoch eine Entwindung statt, die es darüberhinaus erlaubt, kinetische Bestimmungen der Entwindung vorzunehmen.

Völlig überraschend stellte es sich weiterhin heraus, daß bei diesem pH-Wert die Fluoreszenzwerte stabiler sind. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem bekannten Verfahren (DE 197 24 761 A1) ist die Möglichkeit, nicht nur den sogenannten SSF-Wert (strand scission factor, Meyn and Jenkins, Cancer Res. 43, 5668; 1983) aus den Fluoreszenzwerten nach ca. 20 Minuten nach Zugabe der entsprechenden Lösungen zu den Zellen und/oder Geweben zu bestimmen, sondern auch die Neigung der DNA-Denaturierungskurve (Auftragung der Intensität der Fluoreszenz-Emission, die dem Anteil an Doppelstrang-DNA proportional ist, gegen die Zeit) zu ermitteln. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Neigung $\times (-1)$ und dem SSF $\times (-1)$ -Wert.

Schließlich hat sich der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen als ausgesprochen zuverlässig und somit vorteilhaft bewährt.

Die Vorteile des hier beschriebenen Verfahrens liegen darin, daß

1. es die Bestimmung der DNA-Integrität auch bei niedrigen Taxa ermöglicht, deren DNA eine vergleichsweise geringe Komplexität besitzt;
2. es die Bestimmung von DNA-Integrität mit einer mehr als zweifach höheren Empfindlichkeit als das bekannte Verfahren (DE 197 24 761 A1) erlaubt;
3. es auf Mikrotiterplatten (hoher Probendurchsatz) in drei Stunden durchgeführt werden kann;
4. die Ergebnisse sowohl als SSF als auch als Geschwindigkeit der zeitabhängigen DNA-Denaturierung (= Neigung der DNA-Denaturierungskurve) angegeben werden können; und
5. der pH-Wert bei der bei dem Entwindungsschritt der DNA stabil ist und somit mit der Zeit keiner Verschiebung unterliegt, die zu einer Veränderung der Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffs und damit zu einer Verfälschung des Meßergebnisses führt.

Der nachfolgende Kit zur Bestimmung von DNA-Einzelsträngen weist die oben genannten Vorteile auf: Der Kit enthält mindestens ein Detergens, mindestens eine chaotrope Substanzlösung, deren Konzentration bei der Lyse 2 bis 4 mol/l, beträgt, mindestens eine Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanzlösung, mindestens eine Lösung zur Einstellung des zur DNA-Entwindung (Schritt b.) benötigten pH-Wertes, die eine Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz enthält, und mindestens einen spezifisch DNA-Einzelstrang- oder DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff.

Die nachfolgenden Ausführungsformen des Kits sind aus obigen Gründen und wegen ihrer Bewährung in der Praxis als vorteilhaft anzusehen: Die Konzentration der Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz bei der Lyse beträgt 0,005 bis 0,1 mol/l; der pH-Wert beim Versetzen der die lysierten Zellen/Gewebe enthaltenden Suspensionen mit der Lösung zur Einstellung des zur DNA-Entwindung benötigten pH-Wertes beträgt 11 bis 12; die Konzentration der Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz nach der Einstellung des zur DNA-Entwindung benötigten pH-Wertes beträgt 0,005 bis 0,1 mol/l; als Detergens wird SDS verwendet; als chaotrope Substanz wird Harnstoff verwendet; als Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz wird EDTA verwendet; als Fluoreszenzfarbstoff wird PicoGreen verwendet.

Die nachfolgenden Verwendungen des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Kits weisen die oben aufgeführten überraschenden und vorteilhaften Eigenschaften ebenso auf. Es geht hierbei um Verwendungen zum:

- Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen in humanen, tierischen oder pflanzlichen Geweben und Zellen, in Bakterien und Einzellern, in Zelllinien humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs und subzellulären Fraktionen, sowie in isolierter DNA;
- Nachweis von DNA-Reparatur in humanen, tierischen oder pflanzlichen Geweben und Zellen, in Bakterien und Einzellern, in Zelllinien humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, subzellulären Fraktionen, Zell-Lysaten und Zell-Extrakten (isolierte Moleküle);
- Messung des Auftretens von DNA-Einzelstrangbrüchen und deren Reparatur nach Bestrahlung, Chemotherapie und/oder Behandlung mit Gentoxinen in humanem und tierischem Probenmaterial, Gewebeschnitten und Zellsuspensionen;
- Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen in gefrorenen Untersuchungsmaterialien (beispielsweise Biopsieproben) nach deren schonender Homogenisation in flüssigem Stickstoff oder flüssiger Luft in Gegenwart eines Gefrierschutzmittels (beispielsweise Dimethylsulfoxid);
- Nachweis des Auftretens von DNA-Einzelstrangbrüchen und deren Reparatur bei berufsbedingter Exposition von Personen, die entweder bei ihrer beruflichen Arbeit (beispielsweise Flugpersonal, Röntgenärzte) oder infolge von Unfällen (beispielsweise Reaktorunfälle) mit DNA-schädigenden Substanzen oder Strahlen in Kontakt kommen;
- Messung des Auftretens von DNA-Einzelstrangbrüchen und deren Reparatur in Testorganismen, Geweben, Zellen oder Zelllinien bei der Gewässerüberwachung.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

Figur 1: Diese Figur stellt die DNA-Strangbrüche (angegeben als SSF x (-1)) in den Kiemen von *Mytilus galloprovincialis* dar nach der Behandlung der DNA im TE-Homogenat (TE:10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA; pH 7,4) mit Bleomycin, bestimmt mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens (Einzelstrang-Verfahren) (schwarze Balken) und des in DE 197 24 761 A1 offenbarten Verfahrens (weiße Balken).

Beispiele für die Durchführung des Assays (Einzelstrang-Verfahren):

Materialien: Die bei den nachfolgend beschriebenen Experimenten verwendeten Chemikalien wurden von E. Merck (Darmstadt, Deutschland) oder von Sigma (St. Louis, USA) bezogen. Der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen wurde von Molecular Probes, Leiden, Niederlande, erworben.

Durchführung des Assays: Die Detektion erfolgte in den geschilderten Beispielen mittels eines Fluoreszenz-ELISA-Platten-Readers (Fluoroskan II, Labsystems, Helsinki, Finnland).

Lösungen:

PicoGreen dsDNA-Quantifizierungsreagenz Stock in DMSO (Molecular Probes);

TE-Puffer: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH= 7,4;

Lyselösung: 4,5 mol/l Harnstoff, 0,1 % SDS, 40 mmol/l EDTA, pH=10,0;

Lyselösung mit PicoGreen: Verdünnung der Original-PicoGreen-Lösung: 20 µl/ml Lyselösung

NaOH-EDTA-Lösung: Aus einer 0,4 molaren NaOH-Lösung, enthaltend 20 mmol/l EDTA, wird durch Verdünnung mit einer 20 mmolaren EDTA-Lösung eine 0,2 molare NaOH-EDTA-Lösung hergestellt. Aus dieser Lösung wird die NaOH-EDTA-Arbeitslösung durch weitere Verdünnung mit der 20 mmolaren EDTA-Lösung unmittelbar vor den Experimenten hergestellt (pH = 11,50).

Vorgehensweise:

- a.) Es wird eine Zellsuspension in TE-Puffer mit einem pH von 7,4 (falls bequemer, im Zentrifugationsmedium) hergestellt mit einer Zelldichte von 150×10^3 Zellen/ml. (Anmerkung: in Experimenten mit Lymphozyten etwa 3500 – 4500 Zellen/25µl, ca. 30 ng DNA).
- b.) Die Lyse der Zellen findet direkt in den Wells von schwarzen Mikrotiterplatten für 40 min bis 1 h im Dunkeln auf Eis statt. Zu 25 µl Zellsuspension pro Well werden langsam 25 µl Lyselösung mit PicoGreen hinzugefügt. Es darf nicht gemischt und nicht geschüttelt werden.
- c.) Die DNA-Entwindung läßt man bei pH 11,50 wie folgt ablaufen: Zu jeder Probe (pro Well) werden 250 µl der NaOH-EDTA-Lösung hinzugegeben, um einen pH von 11,50 zu erhalten.
- d.) Messung der Intensität der Fluoreszenz-Emission über einen Zeitraum von bis zu 1 h, z.B. alle 5 min; bei Verwendung von PicoGreen: Exzitation: 480 nm; Emission: 520 nm. Als Fluoreszenz-Leerwert wird die Fluoreszenz einer Mischung von 25 µl TE-Puffer, 25 µl Lyselösung mit PicoGreen und 250 µl der NaOH-EDTA-Arbeitslösung gemessen.
- e.) Berechnung: Da jede Probe im Hinblick auf den Leerwert korrigiert werden muß, wird von den Werten der Mittelwert des Leerwertes subtrahiert. Es werden Mehrfachbestimmungen durchgeführt (in der Regel 4 – 6 Bestimmungen). Der Prozentsatz an doppelsträngiger DNA (dsDNA) für die nichtbehandelten (beispielsweise nicht bestrahlte oder nicht mit Substanz behandelte Zellen) zum Zeitpunkt 0 wird als 100 % dsDNA gesetzt. Die gemessenen Effekte werden als "Strand Scission Factor" (SSF) ausgedrückt und nach einem Entwindungs-Zeitraum von 20 Minuten folgendermaßen berechnet: $SSF = \log(\% \text{ dsDNA in der behandelten Probe} / \% \text{ dsDNA in der Kontrollprobe})$. Negative Werte für SSF zeigen eine erhöhte Frequenz von DNA-Strangbrüchen an. Für graphische Auftragungen werden die im Falle von DNA-Strangbrüchen negativen SSF-Werte mit (-1) multipliziert (Darstellung der $SSF \times (-1)$ – Werte).

Durchführung des Assays bei Gewebeproben:

Das Protokoll für Gewebe entspricht dem für Zellsuspensionen mit folgenden Modifikationen:

1. Das Gewebe muß sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.
2. Die benötigte Gewebe-Menge pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte beträgt ca. 25 µg.
3. Man homogenisiert 10 mg des Gewebes in 1 ml Homogenisationspuffer in einem Mörser mit einem Pistill unter flüssigem Stickstoff. Homogenisationspuffer: TE-Puffer (siehe oben) oder anderer geeigneter Puffer mit 10 % Cryoprotektor (Dimethylsulfoxid).
4. Man verdünnt das Homogenisat 10-fach mit TE-Puffer.
5. In jede Vertiefung (Well) wird 25 µl des Homogenisats gegeben; dann werden 25 µl der Lyselösung mit PicoGreen (siehe oben) hinzugegeben.
6. Weiter wird entsprechend der Prozedur für Zellsuspensionen vorgegangen.

Bestimmung der DNA-Einzelstrangbrüche in der Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis* nach Behandlung der DNA im TE-Homogenat von Kiemen mit Bleomycin

Durchführung: Kiemen der Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis* wurden homogenisiert nach dem in DE 197 24 761 A1 beschriebenen Verfahren in TE-DMSO-Puffer (DMSO = Dimethylsulfoxid), verdünnt zu einer Konzentration von 30 ng DNA/25 µl und anschließend mit Eisen aktiviertem Bleomycin für 3 min auf Eis behandelt. Danach wurde die DNA sowohl nach dem in DE 197 24 761 A1 beschriebenen Verfahren als auch nach dem erfindungsgemäßen Verfahren analysiert. Die Bestimmung der DNA-Einzelstrangbrüche erfolgte unmittelbar nach der Inkubation.

Ergebnis: Figur 1 zeigt, daß mit dem herkömmlichen Verfahren kein Nachweis einer Induktion von DNA-Schäden (Einzelstrangbrüche) möglich ist. Dagegen ist das hier beschriebene Verfahren in der Lage, die bei Bleomycin-Behandlung auftretenden DNA-Einzelstrangbrüche bereits bei Inkubation in Gegenwart von einer Konzentration von 2,5 µmol/l Bleomycin nachzuweisen. Mit zunehmendem Anstieg der Bleomycin-Konzentration kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der DNA-Einzelstrangbrüche (Zunahme von $SSF \times (-1)$).

Figur 2: stellt die Abhängigkeit des Auftretens von DNA-Doppelstrangbrüchen, ausgedrückt in Form des $SSF \times (-1)$ -Wertes, in HeLa-Zellen nach Inkubation der Zellen für 4 Stunden in Gegenwart verschiedener Konzentration an Bleomycin dar (Doppelstrang-Verfahren; 3800 Zellen/Well).

Figur 3: eine perspektivische Darstellung einer Ausführungsform gemäß der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum kontrollierten Filtrieren mittels Absaugeinrichtung;

Figur 4: eine perspektivische Darstellung einer Ausführungsform gemäß der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum kontrollierten Filtrieren mittels Druckbeaufschlagungseinrichtung.

Beispiele für die Durchführung des Assays (Doppelstrang-Verfahren):

Materialien: Die bei den nachfolgend beschriebenen Experimenten verwendeten Chemikalien wurden von E. Merck (Darmstadt) oder Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) erworben. Der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen wurde von Molecular Probes, Leiden, Niederlande, bezogen.

Durchführung des Assays: Die Detektion erfolgt in den geschilderten Beispielen mittels eines Fluorimeters (Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Readers; z.B. Fluoroskan II der Firma Labsystems).

Benötigte Materialien:

1. 96-Well-Filterplatten (Filtrationsplatten), an deren Wells 96 unabhängige Membranen verschweißt sind, z.B. MultiScreen Filtrationsplatten der Firma Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland) (z.B. GV, 0,22 µm Durapore).
2. 96-Well-Mikrotiterplatten.
3. Eine weiter unten ausführlich dargestellte Vorrichtung zum kontrollierten Filtrieren mittels einer Absaugeinrichtung oder einer Druckbeaufschlagungseinrichtung.

Lösungen:

1. PicoGreen dsDNA-Quantifizierungsreagenz Stock in DMSO (Molecular Probes)
2. TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
3. Lyselösung: 40 mM EDTA, 4,5 M Harnstoff, 0,1 Gew.-% SDS, pH 10
4. Lyselösung mit PicoGreen: Verdünnung der Original-PicoGreen-Lösung: 20 µl/ml Lyselösung
5. Elutionslösung: aus 10 ml TE-Puffer plus 10 ml Lyselösung plus 100 ml bidest. Wasser

Vorgehensweise:

1. Es wird eine Zellsuspension in TE-Puffer mit einem pH von 7,4 hergestellt mit einer Zelldichte von 150.000/ml. (etwa 3500 – 4500 Zellen/25 µl, ca. 30 ng DNA).
2. Die Lyse der Zellen findet in den Wells der 96-Well-Filtrationsplatten für 40 min bei Raumtemperatur im Dunkeln statt. Zu 25 µl Zellsuspension (pipettiert auf der Filter-membranoberfläche) werden langsam 25 µl Lyselösung mit PicoGreen hinzugefügt.
3. In einem Parallelansatz (zur Bestimmung der Gesamt-DNA pro Well; = Totalwert) wird die Lyse der Zellen in den Wells einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte wie unter 2. beschrieben durchgeführt. Vom Totalwert wird anschließend die Fluoreszenz gemessen.
4. Zugabe von 250 µl Aqua bidest. pro Well der 96-Well-Filtrationsplatten und der schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte.
5. Nach Anstellen der Vakuumpumpe werden die Lösungen in den Wells der 96-Well-Filtrationsplatten mit niedriger Geschwindigkeit (35 µl pro Well pro Minute) durch die Filter hindurchgesaugt (Dauer: 7 min). Die Filtrate werden in einer sich im Vakuumhalter unter der Filtrationsplatte befindenden schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte gesammelt. Die Fluoreszenz der DNA-PicoGreen-Komplexe in den Filtraten wird anschließend gemessen.
6. Messung der Fluoreszenz (bei PicoGreen: Exzitation: 480 nm; Emission: 520 nm). Fluoreszenz-Leerwerte werden erhalten, indem in den Schritten 2 und 3 25 µl Lyselösung mit PicoGreen zu 25 µl Wasser (oder TE-Puffer) anstelle der Zellsuspension pipettiert wird.
7. Berechnung: Für jede Probe sowie für den Leerwert werden Mehrfachbestimmungen durchgeführt (4 – 6 Bestimmungen). Die Proben werden im Hinblick auf den Leerwert korrigiert, indem von den gemessenen Werten der Mittelwert des Leerwertes subtrahiert wird. Die Ergebnisse werden angegeben als "DNA Filter Ratio" (DFR). Die Berechnung des DFR erfolgt nach der Formel: $[(tDNA - \sum fDNA_n) / tDNA] \times 100$, mit n = Fraktionsnummer; tDNA –

Totalwert der Fluoreszenz; $fDNA_n$ – Fluoreszenz der Fraktion n. Im Falle der Sammlung einer Fraktion ist $n=1$. Niedrige DFR-Werte zeigen eine erhöhte Zahl von DNA-Doppelstrangbrüchen an. Alternativ können die Ergebnisse in Form des "Strand Scission Factors" (SSF) angegeben werden. In diesem Fall erfolgt die Berechnung nach der Formel: $SSF = \log (DFR_p / DFR_k)$. DFR_p = DFR-Wert für die zu bestimmende Probe; DFR_k = DFR-Wert für die Kontrolle. Negative SSF-Werte zeigen eine erhöhte Zahl an Doppelstrangbrüchen an.

Durchführung des Assays bei Gewebeproben:

Das Protokoll für Gewebe entspricht dem für Zellsuspensionen mit folgenden Modifikationen:

1. Das Gewebe muß sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt werden (eine Aufbewahrung über kürzere Zeiträume kann auch bei -80°C erfolgen).
2. Die Gewebe-Menge pro Well der Mikrotiterplatte beträgt üblicherweise ca. 25 μg .
3. Man homogenisiert 10 mg des Gewebes in 1 ml Homogenisationspuffer in einem Mörser mit einem Pistill unter flüssigem Stickstoff. Homogenisationspuffer: TE-Puffer (siehe oben) oder anderer geeigneter Puffer mit 10 % Cryoprotektor (Dimethylsulfoxid, Glycerin etc.).
4. Man verdünnt das Homogenisat 10-fach mit TE-Puffer.
5. In jedes Well der 96-Well-Filtrationsplatte wird 25 μl des Homogenisats gegeben; DNA werden 25 μl der Lyselösung mit PicoGreen (siehe oben) hinzugegeben.
6. Weiter wird entsprechend der Prozedur für Zellsuspensionen vorgegangen.

Bestimmung der DNA-Doppelstrangbrüche in HeLa-Zellen nach Inkubation mit Bleomycin

Durchführung: HeLa-Zellen wurden in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Bleomycin (Induzent von DNA-Doppelstrangbrüchen; Byrnes and Petering, Rad. Res. 137: 162; 1994) für 4 Stunden inkubiert. *Ergebnis:* Figur 2 zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche [$SSF \times (-1) - \text{Werte}$] nach Inkubation der Zellen mit Bleomycin.

Vorrichtungen zum kontrollierten Filtrieren von flüssigen Medien mit Well-Filterplatten

Beschreibung der Absaug-Filtrationsvorrichtung

Die in Figur 3 wiedergegebene Absaugfiltrationsvorrichtung besteht aus folgenden Teilen:

- 1 Acrylglasaufsatz bestehend aus einem äußeren Acrylglasrahmen und einer darauf aufsitzenenden Acrylglasplatte. In dem äußeren Acrylglasrahmen befindet sich ein eingepaßtes Belüftungsrohr (1a) mit damit verbundenem Ventil zur Regulation des Vakuums in der oberen Vakuumkammer (nicht gezeigt in Figur 3). Durch den Umströmhahn (1b) kann je nach Stellung die obere von der unteren Vakuumkammer getrennt oder verbunden werden. (1c) Bohrung im Acrylglasaufsatz, die durch den Umströmhahn geöffnet bzw. geschlossen werden kann.
- 2 Dichtungsring zwischen dem Acrylglasaufsatz und der 96-Well-Filterplatte (angebracht an der Innenseite des Deckels des Acrylglasaufsatzes).
- 3 96-Well-Filterplatte mit eingeschweißten Filtern (z.B. Millipore MAGV N22).

- 4 Spacer zwischen der 96-Well-Filterplatte und der schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte.
- 5 Schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte (z.B. Maxisorb der Fa. Nunc).
- 6 Dichtungsring, der am unteren Rand des Acrylglasaufsatzes befestigt ist (aus Abbildung nicht erkenntlich) und der den Acrylglasaufsatz gegen die Bodenplatte abschließt.
- 7 Bodenplatte mit 4 Füßen und in der Mitte der Bodenplatte nach obenhin endender Bohrung sowie eingesetztem Saugrohr (7a) für den Anschluß an eine Vakuumquelle.

Arbeitsprinzip: Die Filtrationsvorrichtung weist einen Acrylglasaufsatz (1) auf, der auf eine Bodenplatte (7) plaziert wird. Durch die im unteren Rand des Acrylglasaufsatzes vorhandene Silicondichtung (6) kann der Raum unter dem Aufsatz luftdicht abgeschlossen werden. Unter diesen Acrylglasaufsatz werden eine leere Mikrotiterplatte (5) und eine bereits mit Proben bestückte Filterplatte (3) so angeordnet, daß die Filterplatte auf der Mikrotiterplatte und diese auf der Bodenplatte zu liegen kommt (s. Fig. 3). Daß sich dabei ein Well der Filterplatte direkt über dem entsprechenden Well der Mikrotiterplatte befindet, wird dadurch gewährleistet, daß die beiden Platten exakt in den Acrylglasaufsatz eingepaßt sind, so daß ein Verschieben der Platten gegeneinander nicht möglich ist. Unter dem Acrylglasaufsatz befinden sich zwei getrennte Lufträume, einen oberen Luftraum, der sich zwischen Acrylglasaufsatzdeckel und Filterplattenoberseite befindet, und einen unteren, der von der Filterplattenunterseite bis zur Bodenplatte reicht. Die Trennung der beiden Lufträume wird durch eine Silicondichtung erreicht, die sich nach dem Aufbau des Gerätes zwischen der Deckenplatte des Acrylglasaufsatzes und der Oberseite (randständige Partien) der Filterplatte befindet. Diese beiden Kammern (Lufträume) stehen jedoch zunächst durch eine Bohrung (1c) in der Wand des Acrylglasaufsatzes miteinander in Verbindung. Über einen Umströmhahn (1b) kann diese Verbindung geschlossen bzw. geöffnet werden. Nach korrekter Zusammensetzung der einzelnen Komponenten der Apparatur kann nun eine Vakuumquelle an das Saugrohr (7a) angeschlossen werden. Das Saugrohr bildet den Abschluß einer Bohrung in der Bodenplatte, deren anderes Ende sich in der Mitte der Bodenplatte der unteren Kammer befindet. Zwei schmale Spacer (4), die zwischen Filterplatte und Mikrotiterplatte gelegt werden, verhindern, daß bei Anlegen des Vakuums durch ein zu dichtes Aufsitzen der Filterplatte die Wells der Mikrotiterplatte verschlossen werden und damit vom unteren Kammerraum abgetrennt werden. Wenn die Verbindung zwischen der unteren und oberen Kammer mit Hilfe des Umströmhahns geöffnet ist, wird nach Anlegen des Vakuums sowohl die untere als auch die obere Kammer evakuiert. Bei Anlegen des Vakuums muß diese Verbindung immer geöffnet sein, um ein gleichmäßiges Evakuieren der beiden Kammern zu gewährleisten. Danach wird die Verbindung zwischen den beiden Kammern geschlossen, indem der Umströmhahn um 180° gedreht wird. Die beiden Kammerräume sind danach vollständig voneinander getrennt. Nun wird die obere Kammer durch Öffnen des Ventils am im Acrylglasaufsatz integrierten Belüftungsrohr belüftet, wobei die untere Kammer evakuiert bleibt. Durch den dadurch entstehenden höheren Unterdruck in der unteren Kammer im Vergleich zur oberen Kammer werden die in die Wells der Filterplatte pipettierten Proben durch die den Boden der Wells bildenden Filter in die untere Kammer gesaugt,

wobei das Filtrat in den Wells der Mikrotiterplatte aufgefangen wird. Die Filtrationsgeschwindigkeit kann mittels des Ventils am Belüftungsrohr reguliert werden. Zur Durchführung des Verfahrens zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen wird eine Filtrationsgeschwindigkeit von 300 $\mu\text{l}/15 \text{ min}$ pro Well empfohlen. Das angelegte Vakuum bleibt während des gesamten Filtrationsvorgangs angeschaltet. Nach vollständiger Filtration kann der Acrylaufsatz abgenommen werden, wobei das Filtrat in den Mikrotiterplatten für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht.

Unterschied zu anderen Apparaten: Das im Vergleich zu herkömmlichen Apparaten (z.B. Absaugfiltrationsvorrichtung "Vakuum-Manifold" der Fa. Millipore GmbH) Neue des in Figur 3 gezeigten Apparates besteht darin, daß zunächst durch Verbindung der Öffnung 7a mit der Vakuumquelle sowohl in der oberen als auch in der unteren Kammer der gleiche Unterdruck anliegt und somit eine Abdichtung der Apparatur nach außen hergestellt wird. Im zweiten Schritt wird DNA durch Umstellen des Umströmhahns 1b die Verbindung zwischen oberer und unterer Kammer getrennt. Durch Öffnen der Bohrung 1a und den über das Ventil kontrollierten Einstrom von Außenluft wird dann der Druck in der oberen Kammer so eingestellt, daß ein Durchsaugen der Lösung durch die Filter mit kontinuierlicher und den experimentellen Bedingungen angepaßter Geschwindigkeit stattfindet. Das Prinzip dieser Konstruktion erlaubt ein langsames und kontinuierliches Hindurchsaugen von Lösung durch die Filter bei nur geringen Druckunterschieden zwischen der oberen und der unteren Kammer. Dies ist bei herkömmlichen Absaugfiltrationsvorrichtungen (z.B. Vakuum-Manifold der Firma Millipore GmbH) nicht möglich, da der für das Ingangsetzen des Saugvorgangs notwendige Ansaugdruck (Anpreßdruck an den Dichtungsring) bei diesen Geräten eine größere Druckdifferenz zwischen den Räumen oberhalb und unterhalb des Filters erfordert. Auch läßt sich das Regelventil nicht soweit herunterregeln, daß die erforderliche langsame Filtrationsgeschwindigkeit (20 $\mu\text{l}/\text{min}$ und darunter bei Verwendung von 96-Well-Mikrofilterplatten mit einem Fassungsvermögen von 300 $\mu\text{l}/\text{Well}$) erreicht wird, die zur Messung von DNA-Doppelstrangbrüchen bei Anwendung des hier vorliegenden Verfahrens benötigt werden.

Abgrenzung dieser Filtrationsvorrichtung von der in der Patentanmeldung EP 0359249 beschriebenen Filtrationsvorrichtung: In der Patentanmeldung EP 0359249 wird eine Filtrationsvorrichtung beschrieben, bei der ebenfalls eine Mikrofilterplatte und eine Mikrotiterplatte verwendet wird. Das dieser Apparatur zugrundeliegende Prinzip unterscheidet sich jedoch von demjenigen der in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen ersten Filtrationsvorrichtung. So wird bei dem hier beschriebenen Gerät im Gegensatz zu der in der Patentanmeldung EP 0359249 beschriebenen Filtrationsvorrichtung zunächst in beiden Kammern ein Unterdruck erzeugt, der dann in der einen (oberen) Kammer soweit herabgesetzt wird, bis der Filtrationsvorgang mit der gewünschten Geschwindigkeit abläuft. Eine Klammer wird bei der hier beschriebenen Vorrichtung im Gegensatz zu der in EP 0359249 beschriebenen Filtrationsvorrichtung nicht verwendet.

Der Vorteil der in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Konstruktion besteht darin, daß hierbei der bei anderen Apparaturen für die Erzeugung des luftdichten Verschlusses notwendige Anpreßdruck, der zu einem zu schnellen initialen Durchtritt von Flüssigkeit durch die Filter führen würde, umgangen wird.

Für die Anwendung der von uns für die DNA-Strangbruchbestimmungen benötigten Filtrationsvorrichtungen ist ein konstanter Flüssigkeitsstrom durch die Filter essentiell. Weiterhin muß betont werden, daß die Porenweite der Filter der von uns für die DNA-Strangbruchbestimmungen verwendeten Filterplatten so gering ist, daß eine Filtration infolge Gravitation nicht möglich ist. Aufgrund der geringen Porenweite könnte eine Filtration nach dem in der Patentanmeldung EP 0359249 für das Beispiel Zellkultur beschriebenen Prinzip nicht zustandekommen.

Weiterhin ist das in der Patentanmeldung EP 0359249 durch die dort beschriebene Apparatur gelöste Problem insofern nicht mehr aktuell, da die Mikrofilterplatten inzwischen kommerziell als relativ preiswerte "Wegwerfartikel" erhältlich sind (Firma Millipore). Bei den in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Filtrationsvorrichtungen kommen bei dem Filtrationsvorgang lediglich die benutzten Mikrofilterplatten und die Mikrotiterplatten (beides "Wegwerfartikel") mit den untersuchten Proben in Kontakt, es entfällt also die komplizierte (oder nach Filtration radioaktiver oder infektiöser Proben eventuell nur schwer durchzuführende Reinigung der Geräte.

Beschreibung der Druckfiltrationsvorrichtung

Die in Figur 4 wiedergegebene Druckfiltrationsvorrichtung besteht aus folgenden Teilen:

- 1'' Acrylglasgehäuse (1'') bestehend aus rechteckiger Bodenplatte (1a'') und zwei mit den Längsseiten fest verbundenen Seitenplatten (1b'' und 1c''), sowie einem aufklappbaren Acrylglasdeckel (1d''). An der Innenseite des Aufklappdeckels befindet sich eine Gummidichtung (1e''), die nach dem Schließen des Deckels auf dem äußeren Rahmen der 96-Well-Filterplatte aufsitzt. Weiterhin befindet sich an der vorderen Seite des Acrylglasdeckels eine Verschlussklemme (1f'') zum sicheren Andrücken der Gummidichtung an die 96-Well-Filterplatte nach Schließen der Apparatur. Auf der Hinterseite des Acrylglasdeckels befindet sich ein Regelventil (1g'', z.B. Festo GR-M5B) mit Verbindungsbohrung zum Raum oberhalb der Filterplatte, das gleichzeitig zum Anschließen an eine Preßluftquelle (z.B. Hauspreßluft, Stickstoffflasche oder Aquarienpumpe) dient.
- 2'' 96-Well-Filterplatte, eingeführt über die vordere Öffnung des Acrylglasgehäuses entlang den beiden an den Seitenplatten angebrachten Führungsleisten (1h'') bis zum Anschlag an den mit der unteren Acrylglasplatte verbundenen Acrylglasblock (1i'').
- 3'' schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte zum Auffangen des Filtrats.

Arbeitsprinzip: Der Deckel (1d'') des Acrylglasgehäuses (1''), der über ein Scharnier mit diesem verbunden ist, wird nach oben geöffnet, um das Plazieren der Filterplatte (2'') und der Mikrotiterplatte (3'') im Innern des Gehäuses zu ermöglichen. Die leere Mikrotiterplatte wird auf den Boden (1a'') des Gehäuses gestellt. Die bereits mit Proben gefüllte Filterplatte wird in die zwei Führungsleisten (1h''), die sich auf halber Höhe im Innern des Gehäuses an dessen Seitenwänden (1b'' und 1c'') befinden, eingeschoben (siehe Figur 4). Durch Schließen des Deckels und Anziehen der Verschlussklemme (1f'') werden die beiden Platten gegen einen Anschlag (1i'') geschoben, der sich an dem der Öffnung gegenüberliegenden Ende befindet. Dadurch werden die beiden

Platten automatisch so positioniert, daß ein Well der Filterplatte direkt über dem entsprechenden Well der Mikrotiterplatte gelegen ist. Durch Schließen des Deckels wird außerdem die in der Unterseite des Acrylglasdeckels integrierte Gummidichtung auf die Oberseite der Filterplatte gedrückt. Dadurch entsteht ein kleiner luftdicht abgeschlossener Raum zwischen Acrylglasdeckel und Filterplatte. Nun kann eine Druckquelle, die über die Bohrung und das Regelventil (1g“) mit dem Raum zwischen Acrylglasdeckel und Filterplatte in Verbindung steht, aktiviert werden. Der somit auf die Flüssigkeitssäule in den Wells der Filterplatte ausgeübte Druck ermöglicht die Filtration, wobei die Filtrationsgeschwindigkeit durch das Regelventil, welches die Gasmenge (Luftmenge), die auf die Filterplatte strömt, bis auf nahezu Null herabregeln kann, bestimmt wird. Die Stärke des Druckes sollte möglichst an der Druckquelle selbst gut einstellbar sein. Die durch die Filter durchgetretene Flüssigkeit wird von der Mikrotiterplatte aufgefangen. Zur Durchführung des Verfahrens zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen ist eine Filtrationsgeschwindigkeit von etwa 300 µl/15 min pro Well geeignet. Nach vollendeter Filtration und Unterbrechung der Gaszufuhr können die beiden Platten aus dem Acrylglasgehäuse entfernt werden und das Filtrat in der Mikrotiterplatte weiter untersucht werden. (Die Funktion der Klammer bei dieser Apparatur besteht darin, lediglich einen luftdichten Abschluß oberhalb der Filtrationsplatte sowie eine genaue Positionierung der Filterplatte und der Mikrotiterplatte herzustellen.)

Unterschied zu anderen Apparaten: Das im Vergleich zu herkömmlichen Apparaten Neue des in Figur 4 gezeigten Apparates besteht darin, daß die Filtration der in die Wells der 96-Well-Filterplatte pipettierten Lösungen durch Anlegen eines Überdruckes oberhalb der Filterplatte und nicht durch Anlegen eines Unterdruckes (Vakuum) unterhalb der Filterplatte durchgeführt wird. Ein Vorteil des in dieser Apparatur angewandten Prinzips besteht darin, daß der Filtrationsvorgang mit konstanter Geschwindigkeit durchgeführt werden kann ohne Auftreten des bei Absaugvorrichtungen, die durch Anlegen eines Unterdrucks betrieben werden, auftretenden initialen Drucksprungs infolge des Ansaugvorgangs (Anpreßvorgang an den Dichtungsring). Der Überdruck im Raum oberhalb der 96-Well-Filterplatte kann neben den oben genannten Druckquellen z.B. auch durch Anlegen einer Aquarienluftpumpe erzeugt werden. Außerdem sind Personen bei der Benutzung des Gerätes zur Filtration radioaktiver Materialien während des Filtrationsvorganges vor Strahlung durch die 10 mm dicken strahlenabsorbierenden Acrylplatten geschützt.

Vorteile der zweiten Apparatur: Die Vorteile der hier beschriebenen Druck-Filtrationsvorrichtung im Vergleich zu herkömmlichen Apparaturen liegt insbesondere in ihrer einfachen Handhabbarkeit. Sie ermöglichen eine Filtration auch dann, wenn keine Druckluftquelle vorhanden ist. Somit ist mit diesem Gerät auch für Untersuchungen außerhalb eines mit einer Druckluftquelle ausgestatteten Labors, zum Beispiel auf einem Forschungsschiff (Untersuchung von DNA-Schäden in marinen Organismen), möglich. Weiterhin ermöglicht die besondere Konstruktion der Druck-Filtrationsvorrichtung eine Abschirmung von Strahlung im Falle der Benutzung der Geräte für die Filtration radioaktiver Materialien. Für Filtrationsvorgänge von sauerstoffempfindlichen Substanzen können anstelle der Druckluft inerte Gase enthaltende Druckflaschen benutzt werden. Vergleichbare Apparaturen für Mikrofilterplatten sind kommerziell nicht erhältlich.

Patentansprüche

1.) Verfahren zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen mit folgenden Schritten: (a) Aufgabe von zu untersuchenden Zellen und/oder Geweben auf spezifische Filter; (b) Lyse der Zellen/Gewebe mit mindestens einem Detergens, mindestens einer chaotropen Substanz, mindestens einer Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz und mindestens einem spezifisch DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff, oder Lyse der Zellen/Gewebe mit mindestens einem Detergens, mindestens einer chaotropen Substanz, mindestens einer Protease und mindestens einem spezifisch DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff; (c) Elution der durch die Lyse freigesetzten DNA-Bruchstücke durch die spezifischen Filter, wobei pro Well nur eine Eluat-Fraktion gesammelt wird; (d) Durchführen einer fluoreszenzspektroskopischen Auswertung.

2.) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß beim Lyse-Schritt als chaotrope Substanz Harnstoff mit einer Konzentration von 2,25 mol/l und als Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz EDTA mit einer Konzentration von 0,02 mol/l verwendet wird, die Konzentration des Detergens 0,00175 mol/l beträgt und der pH-Wert bei der Lyse 10 beträgt.

3.) Kit zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen, enthaltend: mindestens ein Detergens, mindestens eine chaotrope Substanz, mindestens eine Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz, mindestens einen spezifisch DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff und mindestens einen spezifischen Filtertyp oder mindestens ein Detergens, mindestens eine chaotrope Substanz, mindestens eine Protease, mindestens einen spezifisch DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff und mindestens einen spezifischen Filtertyp

4.) Vorrichtung zum kontrollierten Filtrieren von flüssigen insbesondere DNA-Moleküle enthaltenden Medien mit Well-Filterplatten, mit mindestens einer Well-Filterplatte (3), mindestens einer korrespondierenden Mikrotiterplatte (5) und einer Absaugeinrichtung (7a), gekennzeichnet durch: zwei voneinander getrennte, ober- und unterhalb der Filterplatte angeordnete Gasräume; mindestens eine mit einem Behältnis (1) und der Well-Filterplatte (3) zusammenwirkende und damit eine vollständige Trennung der beiden Gasräume erzeugende Dichtungseinrichtung (2); eine Einrichtung (1b,1c) zum Verbinden beider Gasräume; eine Einrichtung (1a) zum Druckausgleich zwischen Umgebung und einem Gasraum.

5.) Vorrichtung zum kontrollierten Filtrieren von flüssigen insbesondere DNA-Moleküle enthaltenden Medien mit Well-Filterplatten, mit mindestens einer Well-Filterplatte (2''), mindestens einer korrespondierenden Mikrotiterplatte (3''), gekennzeichnet durch: zwei voneinander getrennte, ober- und unterhalb der Filterplatte angeordnete Gasräume; mindestens eine mit einem Behältnis (1'') und der Well-Filterplatte (2'') zusammenwirkende und damit eine vollständige Trennung der beiden Gasräume erzeugende Dichtungseinrichtung (1e''); eine für einen Gasraum fungierende Druckbeaufschlagungseinrichtung (1g'').

6.) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen und zum kontrollierten Filtrieren von flüssigen insbesondere DNA-Moleküle, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 und 5 verwendet wird.

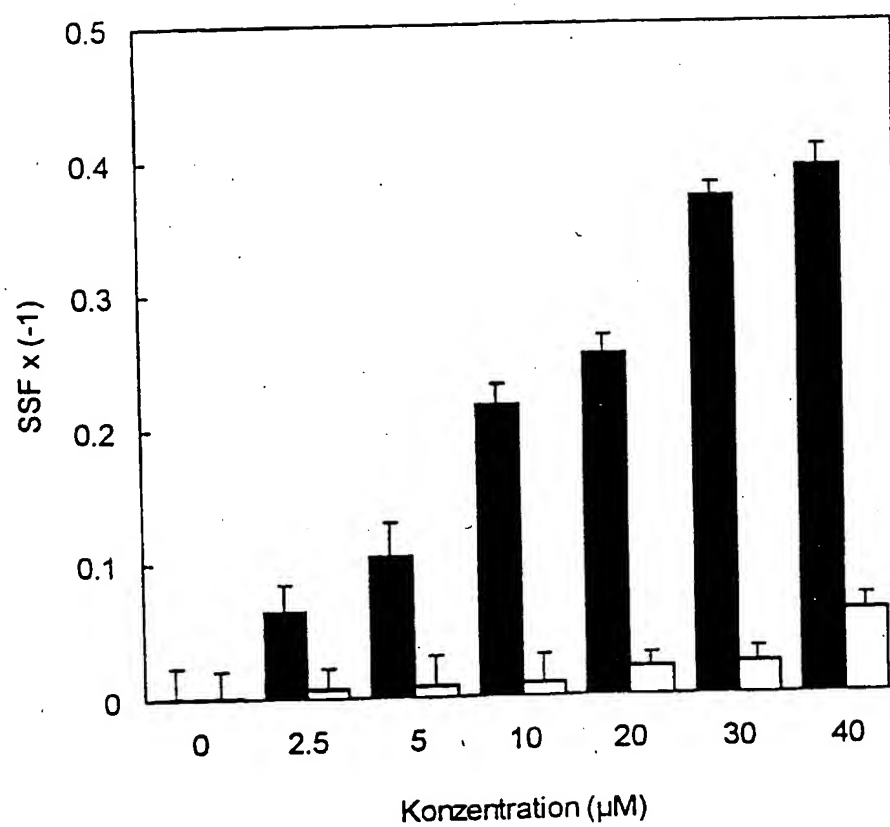
7.) Verfahren zur Bestimmung von DNA-Einzelstrangbrüchen mit folgenden Schritten: (a) Lyse von zu untersuchenden Zellen und/oder Geweben mit mindestens einem Detergens, mindestens einer chaotropen Substanz in Gegenwart mindestens einer Metallionen komplexierenden und DNA-Reparaturenzyme hemmenden Substanz und mindestens einem spezifisch DNA-Einzelstrang oder DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff; (b) Versetzen der die lysierten Zellen und/oder Gewebe enthaltenden Suspension mit mindestens einer Lösung, die es erlaubt, diese Suspension auf einen alkalischen pH-Wert einzustellen und die mindestens eine Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz aufweist; (c) Durchführen einer fluoreszenzspektroskopischen Auswertung,

8.) Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß beim Lyse-Schritt als chaotrope Substanz Harnstoff mit einer Konzentration von 2,25 mol/l, als Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz EDTA mit einer Konzentration 0,02 mol/l und als Detergens SDS mit einer Konzentration von 0,00175 mol/l, bei Schritt b.) als Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz EDTA mit einer Konzentration 0,02 mol/l verwendet wird und der pH-Wert beim Lyse-Schritt 10 und im Schritt b.) 11,5 beträgt.

9.) Kit zur Bestimmung von DNA-Einzelstrangbrüchen, dadurch gekennzeichnet, daß als Detergens SDS, als chaotrope Substanz Harnstoff, als Metallionen komplexierende und DNA-Reparaturenzyme hemmende Substanz EDTA und als Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen verwendet wird.

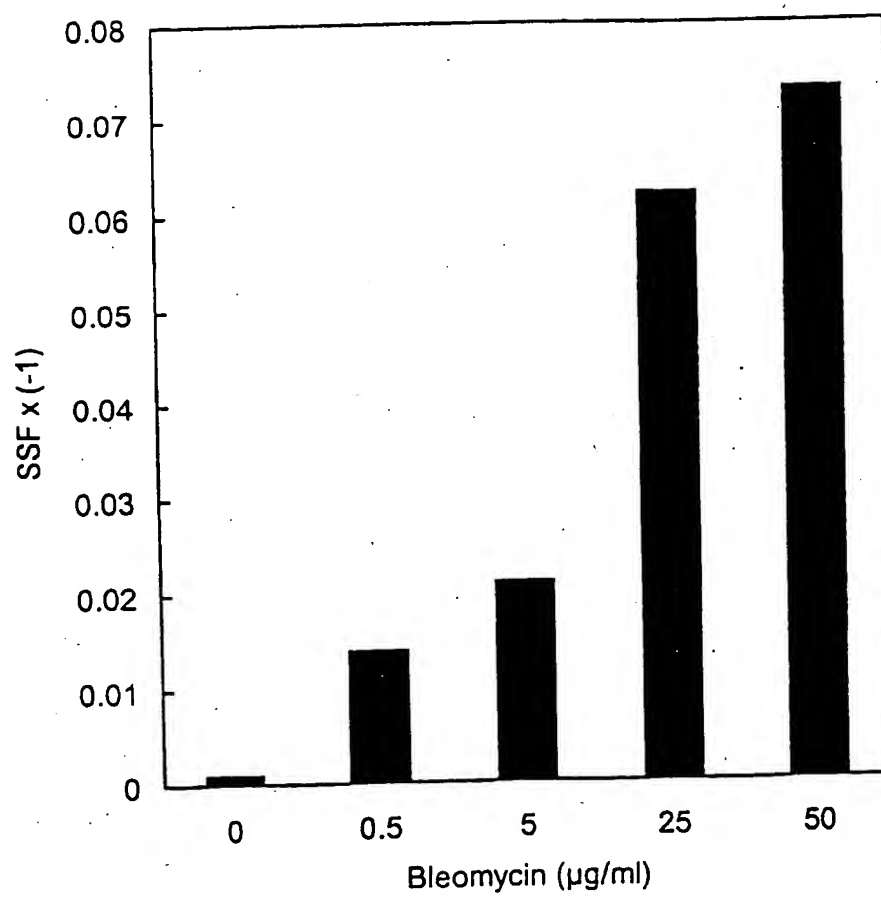
10.) Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1, 2, 6, 7 und 8 und des Kits nach einem der Ansprüche 3 und 9 (a) zum Nachweis von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen in humanen, tierischen oder pflanzlichen Geweben und Zellen, in Bakterien und Einzellern, in Zelllinien humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs und subzellulären Fraktionen, sowie in isolierter DNA; (b) zum Nachweis von DNA-Reparatur in humanen, tierischen oder pflanzlichen Geweben und Zellen, in Bakterien und Einzellern, in Zelllinien humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, subzellulären Fraktionen, Zell-Lysaten und Zell-Extrakten (isolierte Moleküle); (c) zur Messung des Auftretens von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur nach Bestrahlung, Chemotherapie und/oder Behandlung mit Gentoxinen, Mutagenen und Cancerogenen in humanem und tierischem Probenmaterial, Gewebeschnitten und Zellsuspensionen; (d) zum Nachweis von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen in gefrorenen Untersuchungsmaterialien nach deren schonender Homogenisation in flüssigem Stickstoff oder flüssiger Luft in Gegenwart eines Gefrierschutzmittels; (e) zum Nachweis des Auftretens von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur bei berufsbedingter Exposition von Personen, die entweder bei ihrer beruflichen Arbeit oder infolge von Unfällen mit DNA-schädigenden Substanzen oder Strahlen in Kontakt kommen.

1/4

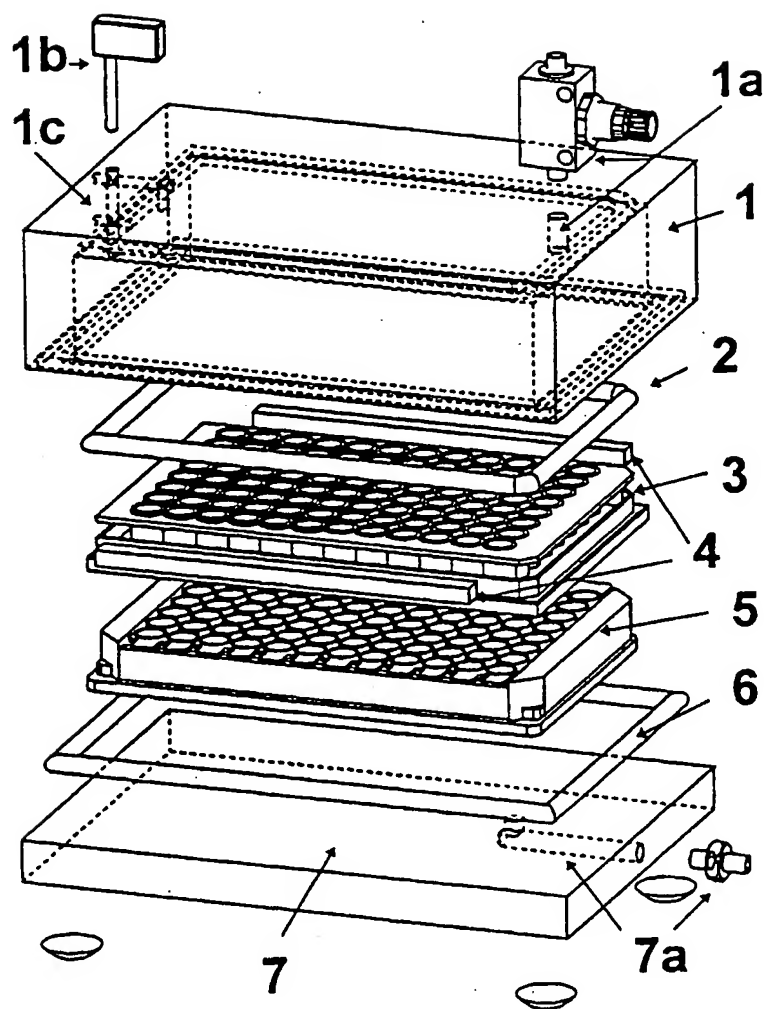


Figur 1

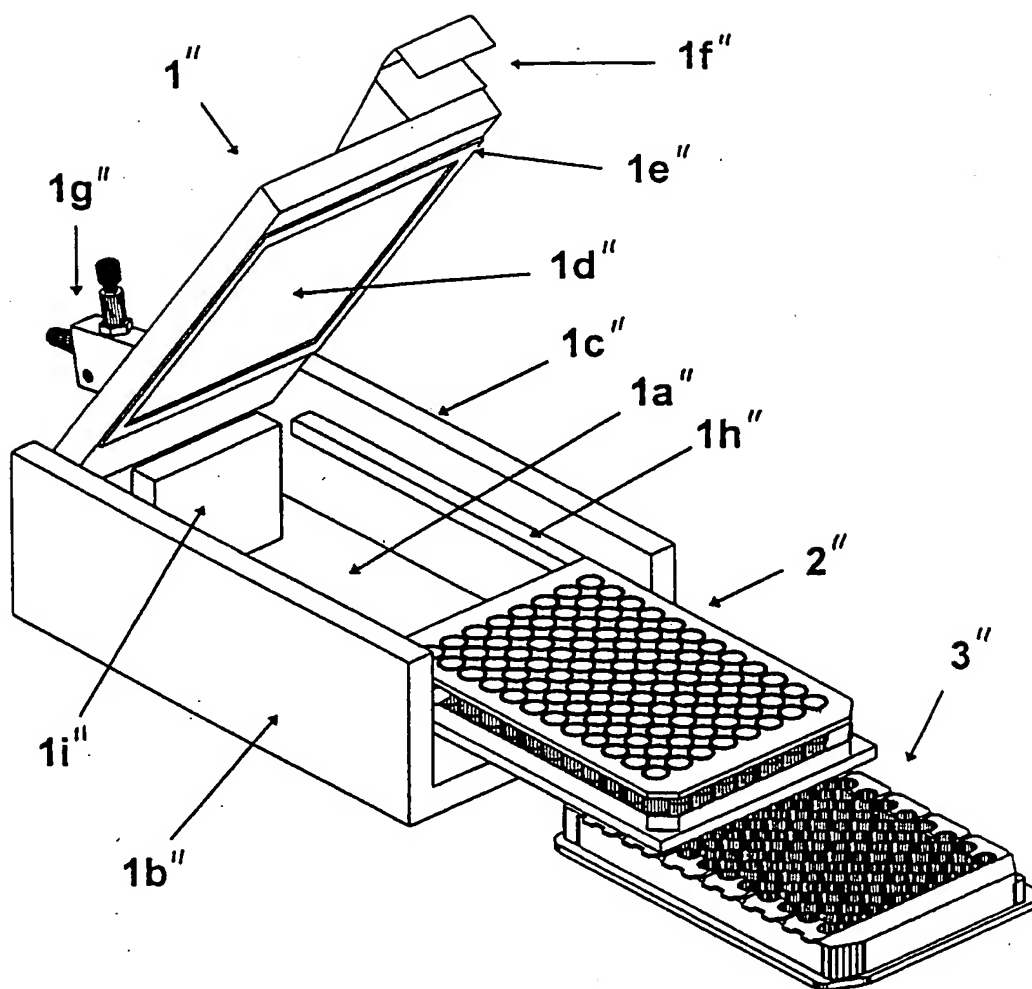
2/4



Figur 2



Figur 3



Figur 4

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

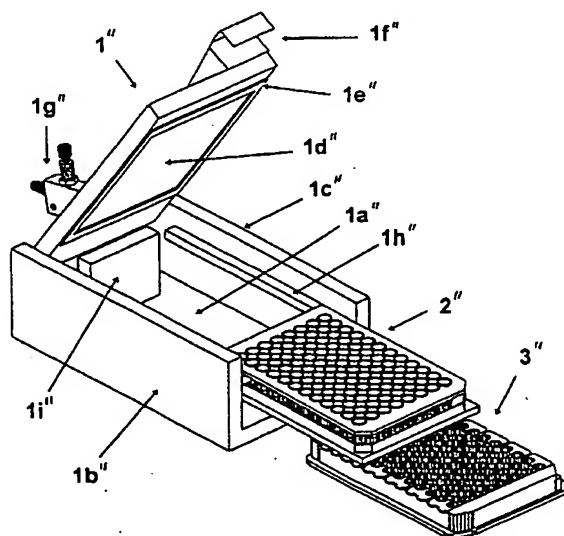
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/06003 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68. SCHRÖDER, Heinz, C. [DE/DE]; Hans-Bredow-Strasse
B01L 3/00 37a, D-65189 Wiesbaden (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06842 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BATEL, Renato
(HR/HR); Marco Garbin 2, 52210 Rovinj (HR).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Juli 2000 (18.07.2000)
(74) Gemeinsamer Vertreter: MÜLLER, Werner, E., G.;
Sammelweisstrasse 12, D-65203 Wiesbaden-Biebrich (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 33 078.6 19. Juli 1999 (19.07.1999) DE
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX;
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: MÜLLER, Werner, E., G. [DE/DE]; Sem-
melweisstrasse 12, D-65203 Wiesbaden-Biebrich (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DETERMINING DNA DOUBLE/SINGLE STRAND BREAKS AND DEVICE FOR CAR-
RYING OUT THE CONTROLLED FILTRATION OF, IN PARTICULAR, DNA MOLECULES WITH WELL FILTER PLATES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND KIT ZUR BESTIMMUNG VON DNA-DOPPEL-/EINZELSTRANGBRÜCHEN UND
VORRICHTUNG ZUM KONTROLLIERTEN FILTRIEREN VON INSBESONDERE DNA-MOLEKÜLEN MIT WELL-FILTER-
PLATTEN



(57) Abstract: The invention relates to, among other things, a method for determining double strand breaks which comprises the following steps: a) depositing cells and/or tissues to be examined on specific filters; b) lysis of the cells/tissue with at least one detergent, with at least one chaotropic substance, and with at least one fluorescence dye that binds specifically a DNA double strand; c) elution of the DNA fragments, released by the lysis, through the specific filters, and; d) carrying out a fluorescence spectroscopic evaluation, whereby only one eluate fraction is collected per well.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/06003 A3



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

Recherchenberichts:

13. Dezember 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(57) **Zusammenfassung:** Es wird unter anderem ein Verfahren zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen bereitgestellt, mit folgenden Schritten: a) Aufgabe von zu untersuchenden Zellen und/oder Geweben auf spezifische Filter; b) Lyse der Zellen/Gewebe mit mindestens einem Detergens, mindestens einer chaotropen Substanz und mindestens einem spezifisch DNA-Doppelstrang bindenden Fluoreszenzfarbstoff; c) Elution der durch die Lyse freigesetzten DNA-Bruchstücke durch die spezifischen Filter; d) Durchführen einer fluoreszenzspektroskopischen Auswertung, wobei pro Well nur eine Eluat-Fraktion gesammelt wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | DE 197 24 781 A (BIHARI NEVENKA DR ;BATEL RENATO DR (DE); MUELLER WERNER E G PROF D) 24 December 1998 (1998-12-24) cited in the application | 9 |
| A | the whole document | 1,7 |
| A | DE 197 25 894 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH) 24 December 1998 (1998-12-24) column 3, line 1 -column 5, line 14 column 10, line 33 -column 11, line 27; claims | 4,5 |
| A | FR 2 618 556 A (ADRIA) 27 January 1989 (1989-01-27) the whole document | 1 |
| | -/-- | |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 April 2001

Date of mailing of the international search report

04/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luzzatto, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06842

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | DUCORE J.M.: "EDTA alkaline elution characteristics and measurement of DNA damage in unlabeled DNA using Hoechst 33258 fluorescence" ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS, vol. 11, 1988, pages 449-460, XP000995522 US p. 451 "Alkaline elution" | 1 |
| A | WO 97 10055 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 20 March 1997 (1997-03-20) claims; figures | 4,5 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06842

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|-------------------------------|--------------------------|
| DE 19724781 A | 24-12-1998 | NONE | |
| DE 19725894 A | 24-12-1998 | WO 9857746 A EP 0989910 A | 23-12-1998 05-04-2000 |
| FR 2618556 A | 27-01-1989 | NONE | |
| WO 9710055 A | 20-03-1997 | EP 0792190 A JP 10510501 T | 03-09-1997 13-10-1998 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06842

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68 B01L3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | DE 197 24 781 A (BIHARI NEVENKA DR ;BATEL RENATO DR (DE); MUELLER WERNER E G PROF D) 24. Dezember 1998 (1998-12-24) in der Anmeldung erwähnt | 9 |
| A | das ganze Dokument | 1,7 |
| A | DE 197 25 894 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH) 24. Dezember 1998 (1998-12-24) Spalte 3, Zeile 1 -Spalte 5, Zeile 14 Spalte 10, Zeile 33 -Spalte 11, Zeile 27; Ansprüche | 4,5 |
| A | FR 2 618 556 A (ADRIA) 27. Januar 1989 (1989-01-27) das ganze Dokument | 1 |
| | --- -/- | |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. April 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/05/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Luzzatto, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/06842

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | DUCORE J.M.: "EDTA alkaline elution characteristics and measurement of DNA damage in unlabeled DNA using Hoechst 33258 fluorescence" ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS, Bd. 11, 1988, Seiten 449-460, XP000995522 US p. 451 "Alkaline elution" | 1 |
| A | WO 97 10055 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 20. März 1997 (1997-03-20) Ansprüche; Abbildungen | 4,5 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06842

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 19724781 A | 24-12-1998 | KEINE | |
| DE 19725894 A | 24-12-1998 | WO 9857746 A EP 0989910 A | 23-12-1998 05-04-2000 |
| FR 2618556 A | 27-01-1989 | KEINE | |
| WO 9710055 A | 20-03-1997 | EP 0792190 A JP 10510501 T | 03-09-1997 13-10-1998 |